

УДК: 616.61–02:613.1–092.9

Модель екодетерминированной нефропатии
С.Н.Мартынова, Е.Э.Перский

Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина (Харьков, Украина)

На модели екодетерминированной нефропатии изучены биохимические показатели сыворотки крови, мочи, гомогенатов почечной ткани, распределение металлов, проведены гистологические и морфологические исследования у крыс, которым вводили воду с повышенным содержанием меди и кобальта. Показано, что экзогенно вводимые медь и кобальт накапливаются в почках, способствуют развитию нефропатий. При введении меди снижается экскреция мочевой кислоты, что способствует развитию дисметаболической нефропатии. При введении кобальта активизируются иммунно-воспалительные процессы, что приводит к развитию гломерулонефрита.

Ключевые слова: крысы, медь, кобальт, нефропатии, биохимические показатели крови и мочи, прооксидантно-антиоксидантная система в почках, протеинограммы, морфология почек, митохондриальные ферменты, ферменты нейтрофилов.

Модель екодетермінованої нефропатії
С.М.Мартінова, Є.Є.Перський

Вивчено біохімічні показники сироватки крові, сечі, гомогенатів ниркової тканини, розподіл металів, проведено гістологічні та морфологічні дослідження у щурів, яким було введено воду з підвищеним вмістом міді та кобальту. Показано, що екзогенно введені мідь та кобальт накопичуються у нирках, сприяють розвитку нефропатій. При введенні міді знижується екскреція сечової кислоти, що сприяє розвитку дисметаболічної нефропатії. При введенні кобальту активізуються імунізапальні процеси, що призводить до розвитку гломерулонефриту.

Ключові слова: щури, мідь, кобальт, нефропатії, біохімічні показники крові та сечі, прооксидантно-антиоксидантна система у нирках, протеїнограми, морфологія нирок, мітохондріальні ферменти, ферменти нейтрофілів.

Model of ecologically determined nephropathy
S.N.Martynova, Ye.E.Persky

Biochemical indexes of blood serum, urine, homogenates of kidney tissue, metal distribution have been studied using the model of ecologically determined nephropathy; histological and morphological investigations in rats, which have been injected by water with increasing content of cobalt and copper, have been conducted. Exogenic injected cobalt and copper have been shown to accumulate in the kidneys, promote nephropathy development. Under copper injection uric acid excretion decreases, that promotes dismetabolic nephropathy development. Under injection of cobalt immuno-inflammatory processes are activated, which leads to glomerulonephritis development.

Key words: rats, copper, cobalt, nephropathies, biochemical indexes of blood and urine, prooxidant-antioxidant system in kidneys, proteinograms, morphology of kidneys, mitochondrial enzymes, neutrophils enzymes.

Введение

За последние годы состояние здоровья населения Украины значительно ухудшилось, что в значительной степени обусловлено антропогенным загрязнением окружающей среды, в частности тяжелыми металлами. Известно, что техногенные загрязнения приводят к изменению структуры адапционно-компенсаторных систем организма, которые для стабилизации основных параметров функционируют в напряженном режиме (Авцын и др., 1991; Башкірова, Руденко, 2004).

Особую опасность повышенные концентрации биогенных элементов представляют для здоровья детей (Нефрология, 2000). В настоящее время установлено, что загрязнение окружающей среды химическими веществами малой интенсивности (к которым относятся и биогенные элементы) обуславливают ряд сопряженных сдвигов в иммунной системе детей, могут стать причиной развития нефропатий (Игнатова и др., 1997; Головачева, Одинец, 2009).

Исследования последних лет во многих регионах Украины, где отмечаются загрязнения солями тяжелых металлов почвы, воздуха, продуктов питания, поверхностных вод, позволили выявить не только высокую частоту заболеваний почек у детей, по сравнению с общепопуляционными данными,

но и признаки генетической предрасположенности к патологии почек (Магальяс, Рудницкий, 2001). В Харьковской области также выявлено повышение числа детей с заболеваниями почек (Golovachova, 2009) по сравнению со средними данными по Украине (42 на 1000), что связывают с загрязнением атмосферы и поверхностных вод тяжелыми металлами.

Проблеме загрязнения воды экотоксикантами, особенно такими двухвалентными металлами, как медь и кобальт, являющимися эссенциальными элементами, но способными вызывать токсические реакции при повышенном содержании в организме, не уделяется должного внимания (Скальный, 1997). В то же время признано, что нефропатии могут быть экодетерминированными (Игнатова и др., 2004).

Анализ данных экологической экспертизы вод показал, что во многих регионах Украины содержание меди в поверхностных водах находится на уровне предельно допустимой концентрации (ПДК), в некоторых населенных пунктах – в 2–6 раз превышает ПДК. Во всех регионах, где содержание меди в воде на уровне ПДК или выше, увеличена частота заболеваний почек в детском возрасте. В г. Чугуеве, например, где по данным экологической экспертизы содержание меди в поверхностных водах – 3,25 мг/л при ПДК до 1 (<http://iac-menr.rgdada.com.ua>), патология почек составляет 118 : 1000 детей, что в 2,8 раза выше средней по Украине (в среднем по Украине 42 на 1000). Данные проведенного анализа свидетельствуют о том, что основные компоненты питьевой воды в городе Чугуеве соответствуют санитарно-гигиеническим нормам: хлориды – 105,5 мг/л (<350); сульфаты – 152,5 мг/л (<500); гидрокарбонаты – 411,5 мг/л (до 600); метакремниевая кислота – 11,5 мг/л (до 60); нитраты – 43,2 мг/л (до 150); жесткость – 2,4 (не более 7); кальций – 108 мг/л; магний – 22 мг/л, а содержание меди повышено – 1,75 мг/л. В населенных пунктах с повышенным содержанием меди в воде отмечено нарастание частоты патологии почек с возрастом детей, однотипность патологических изменений – у обследованных детей ведущим клиническим проявлением патологии является лейкоцитурия, выделение с мочой повышенных концентраций меди, снижение экскреции мочевой кислоты. У детей, проживающих с антенатального периода в указанных «неблагоприятных» регионах, были выражены множественные стигмы дизэмбриогенеза (Волосовец та ін., 1997). У всех больных детей в Чугуеве были выражены мембранно-патологические изменения в почках.

Повышение содержания кобальта до уровня ПДК отмечается лишь в некоторых регионах, в частности во многих населенных пунктах Кировоградской области (в Светловодске), где содержание кобальта в поверхностных водах в 2,2 раза выше ПДК (<http://iac-menr.rgdada.com.ua>). Учитывая, что очистка воды от металлов практически не эффективна, можно ожидать, что кобальт присутствует в повышенной концентрации в питьевой воде. По данным экологической экспертизы основные компоненты питьевой воды в городе Светловодске соответствуют санитарно-гигиеническим нормам: хлориды – 202 мг/л (<350); сульфаты – 178 мг/л (<500); гидрокарбонаты – 385,4 мг/л (до 600); метакремниевая кислота – 0 мг/л (до 60); нитраты – 89,5 мг/л (до 150); жесткость – 3,0 (не более 7); кальций – 115 мг/л; магний – 27 мг/л, медь – 0,45, а содержание кобальта повышено – 0,22 (ПДК до 0,1). Частота выявления патологии почек в Светловодске в 2 раза выше, чем в целом в области. У обследованных детей ведущим клиническим симптомом заболевания является гематурия и протеинурия. В моче детей и их родителей выявлено также повышенное содержание кобальта. Следует отметить, что в структуре нефропатий у детей Светловодска преобладающим является гломерулонефрит (45%), в то время как у детей города Чугуева (как и в целом по Украине) преобладающим типом нефропатии является пиелонефрит.

На основании накопленных в медицинских учреждениях данных можно предположить, что в регионах с содержанием тяжелых металлов в поверхностных водах на уровне ПДК отмечается экодетерминированная нефропатия у детей. Однако имеющихся сведений недостаточно для точного указания этиологического фактора. Для ответа на имеющиеся вопросы относительно этиологии и патогенеза нефропатий в нашей работе была создана модель экодетерминированной нефропатии.

Материалы и методы

Эксперименты проводили на крысах-самцах линии Вистар возрастом 1 месяц, массой 80–90 г, содержащихся в стандартных условиях вивария. Крысы разделены на следующие группы:

1) интактные животные, которым ежедневно в течение 1 месяца внутрижелудочно через зонд вводили 1 мл 721 воды (контрольная группа). Для контрольной группы мы использовали 721 воду вместо дистиллированной потому, что она близка по своему химическому составу к питьевой воде: хлориды – 95,8 мг/л, сульфаты – 105,2 мг/л, гидрокарбонаты – 211,4 мг/л, метакремниевая кислота – 0, нитраты – 20,5 мг/л, жесткость – 2,1, кальций – 109,5 мг/л, магний – 28 мг/л, медь – 0, кобальт – 0. 721 вода – добывается с глубины 700 метров из скважины, которая находится на территории пивзавода «Рогань»;

2) животные, которым ежедневно внутрижелудочно через зонд вводили воду, привезенную из города Чугуева (с содержанием меди 1,75 мг/л из расчета 1 мл на 100 г массы животного);

3) животные, которым в тех же условиях вводили 721 воду, с концентрацией меди, соответствующей воде в городе Чугуеве;

4) животные, которым ежедневно в течение месяца внутрижелудочно через зонд вводили воду, привезенную из города Светловодска (с содержанием кобальта 0,24 мг/л из расчета 1 мл на 100 г массы животного);

5) животные, которым в тех же условиях вводили раствор хлорида кобальта в 721 воде с такой же концентрацией.

Через 1 месяц животные были выведены из эксперимента путем декапитации под легким эфирным наркозом. Определяли массу животных, изучали содержание креатинина, мочевины, белка в сыворотке крови с помощью наборов реагентов фирмы "Lachema" (Чехия). Методом атомно-адсорбционной спектроскопии (Брицке, 1982) определяли содержание меди и кобальта в тканях почек, печени, надпочечников, поджелудочной железы. В гомогенатах почечной ткани определяли содержание продуктов перекисного окисления липидов (диеновых конъюгатов [ДК] (Чвари и др., 1991) и малонового диальдегида [МДА] (Федорова и др., 1983)), спектрофотометрическими методами определяли общую антиоксидантную активность [ОАА], активность каталазы (Гаврилов, Мишкорудная, 1983), супероксиддисмутазы [СОД] (Костюк и др., 1990), содержание АТФ (Ещенко, 1982). В сыворотке крови определяли содержание белковых фракций турбидиметрическим методом с помощью наборов реагентов фирмы «Филисит-диагностикум» (г. Днепропетровск); общую антиоксидантную активность (Кибанов и др., 1988); активность каталазы (Гаврилов, Мишкорудная, 1983), супероксиддисмутазы (Костюк и др., 1990), трансамидиназы (Клінічна біохімія, 2005), содержание церулоплазмينا методом Равина (Подильчак, 1967) – спектрофотометрически; содержание мочевой кислоты с помощью наборов фирмы «Ольвекс Диагностикум» (г. Санкт-Петербург); содержание креатинина (наборы фирмы Lachema (Чехия)); содержание мочевины уреазным методом (наборы реагентов «Филисит Диагностика», г. Днепропетровск); содержание ФНО- α (фактор некроза опухоли) и интерлейкина-1 β – иммуноферментным методом (наборы фирмы «Укрмедсервіс», Донецк); содержание антифосфолипидных антител – иммуноферментным методом (наборы реагентов фирмы «Гранум», Харьков); содержание катионного белка, активность миелопероксидазы нейтрофилов определяли гистохимически в мазках крови (Лабораторные методы исследования ..., 1987). Анализ препаратов проводился с использованием микроскопа Биолам и Olympus BX41 с помощью видеомикроскопической морфометрии с использованием программы Adobe Photoshop (Version 4). Все съемки проведены при увеличении $\times 400$. Анализ изображения с помощью Adobe Photoshop произведен при увеличении 200%. Определение оптической плотности препаратов производилось стандартным методом (Ташке, 1980). Фоновая яркость определялась в результате измерения яркости по стандарту, представляющему собой наложенные друг на друга покровное и предметное стекла. В моче определяли содержание белка по реакции с сульфосалициловой кислотой (Клінічна біохімія, 2005), содержание креатинина и мочевины спектрофотометрически с помощью наборов реагентов «Филисит Диагностика» (г. Днепропетровск).

Методом дифференциального центрифугирования выделяли митохондрии нефроцитов (Johnson, Lardy, 1967). В суспензии митохондрий определяли активность сукцинатдегидрогеназы (Ещенко, Вольский, 1982) и цитохромоксидазы (Асатиани, 1969) спектрофотометрическими методами. Проведено морфологическое изучение микропрепаратов почечной ткани. Статистическую обработку результатов проводили с использованием компьютерной программы "BioStat".

Результаты и обсуждение

Введение меди на протяжении месяца приводит к уменьшению массы животных, по сравнению с контрольными животными, некоторому увеличению удельной массы почки (отношение массы почки к массе тела) (табл. 1); повышению содержания креатинина, мочевины и белка в моче, увеличению содержания креатинина и снижению общего белка в сыворотке крови (табл. 3).

Отмечается увеличение содержания меди в сыворотке крови и в изучаемых тканях (табл. 2), наиболее значительны изменения в печени и в почках.

Также замечено увеличение содержания церулоплазмينا в сыворотке крови: у контрольных животных – $1,65 \pm 0,08$ мкмоль/л; у крыс, которым вводили 721 воду с медью, – $3,79 \pm 0,22$ мкмоль/л; у крыс, которым вводили воду из Чугуева, – $3,11 \pm 0,28$ мкмоль/л.

Таким образом, установлено, что при введении в организм животных раствора хлорида меди и воды г. Чугуева, содержащей медь, отмечаются изменения аналогичной направленности.

В моче животных, получавших избыточное количество меди, отмечается повышенное количество лейкоцитов. Следует отметить, что у животных, получавших медь, начиная с 8 дня, прогрессивно снижался аппетит. Гематурия ни у одного животного не выявлена.

Таблица 1.

Динамика массы тела и удельной массы почек у крыс, получавших избыточное количество хлорида меди в суточном рационе

Группы животных	Масса тела, г			Удельная масса почек (% от массы тела)		
	исходн.	15 суток	31 суток	исходн.	15 суток	31 суток
Контрольная группа (n=15)	89,25±5,18	100,75±7,63	120,26±7,13	3,54±0,12	3,58±0,22	3,49±0,31
Введение воды из г. Чугуева (n=17)	86,79±4,42	93,65±5,11 p>0,05	100,51±3,65 p<0,05	3,39±0,16 p>0,05	4,22±0,28 p<0,05	4,25±0,19 p<0,05
Введение 721 воды с хлоридом меди (n=17)	90,06±6,33	95,11±6,32 p>0,05	98,79±5,02 p<0,05	3,61±0,22 p>0,05	4,13±0,18 p<0,05	4,13±0,27 p<0,05

p – достоверность отличий по сравнению с контрольной группой.

Таблица 2.

Содержание меди в органах и сыворотке крови экспериментальных животных

Группы животных	Сыворотка крови, мкмоль/л	Печень, мг/100г ткани	Надпочечники, мг/100г ткани	Почки, мг/100г ткани	Селезенка, мг/100г ткани
Контрольная группа (n=15)	50,11±2,41	9,75±0,48	48,75±2,64	16,9±1,05	0,35±0,02
Введение воды из г. Чугуева (n=15)	58,38±1,85 p<0,02	19,68±2,03 p<0,001	62,11±3,75 p<0,001	80,33±3,65 p<0,001	0,52±0,03 p<0,01
Введение 721 воды с хлоридом меди (n=15)	56,23±1,84 p>0,02	18,11±3,12 p<0,001	60,93±4,12 p<0,01	81,05±4,32 p<0,001	0,55±0,04 p<0,01

p – достоверность отличий по сравнению с контрольной группой.

Таблица 3.

Содержание креатинина, мочевины, мочевой кислоты и белка в сыворотке крови и моче у экспериментальных животных через месяц после начала введения хлорида меди

Группы животных	Сыворотка крови				Моча			
	креатинин, мкмоль/л	мочевина, ммоль/л	общий белок, г/л	мочевая кислота, ммоль/л	креатинин, ммоль/сут.	мочевина, ммоль/сут.	общий белок, мг/сут.	мочевая кислота, ммоль/сут.
Контрольная группа (n=15)	75,83±3,11	7,22±0,45	76,52±3,14	0,31±0,02	10,25±0,85	417,48±19,45	311,45±20,08	2,16±0,11
Введение воды из г. Чугуева (n=15)	89,68±2,77 p<0,05	12,48±1,07 p<0,01	69,34±1,47 p<0,02	0,48±0,03	11,22±0,93 p>0,05	463,12±10,03 p<0,05	405,22±10,13 p<0,05	1,37±0,08
Введение 721 воды с хлоридом меди (n=15)	90,35±5,22 p<0,05	13,14±1,11 p<0,01	68,72±2,03 p<0,02	0,56±0,04	10,86±1,08 p>0,05	455,12±9,13 p<0,05	396,89±9,45 p<0,05	1,22±0,07

p – достоверность отличий по сравнению с контрольной группой.

Анализ протеинограммы в 90% случаев выявил нефротический тип изменений: снижение α -глобулинов, альбумина при повышенном содержании β - и γ -глобулинов (табл. 4). Следует отметить, что для нефропатий более характерно некоторое снижение уровня γ -глобулинов. Наблюдаемое нами увеличение содержания γ -глобулинов, по-видимому, связано с тем, что медь аккумулируется в интерстициальной ткани почек и других тканях, способствует развитию воспалительного процесса.

Таблица 4.

Белковый спектр сыворотки крови экспериментальных животных

Группа животных	Альбумин, %	Глобулины, %			
		α_1	α_2	β	γ
Контрольная (n=15)	57,45±3,11	4,85±0,33	8,72±0,29	18,34±1,22	10,64±0,93
Введение воды из г. Чугуева (n=15)	42,33±1,68 p<0,02	3,92±0,18 p<0,05	9,58±0,19 p<0,05	23,79±1,16 p<0,05	20,38±1,65 p<0,001
Введение 721 воды с хлоридом меди (n=15)	41,72±2,13 p<0,02	3,44±0,22 p<0,05	9,21±0,22 p<0,05	22,96±1,08 p<0,05	21,67±1,88 p<0,001

p – достоверность отличий по сравнению с контрольной группой.

В сыворотке крови животных, получавших в рационе избыточное количество меди, выявлено повышенное содержание органоспецифического («почечного») фермента трансаминазы: в контрольной группе – не выявляется; у животных, употреблявших чугуевскую воду, – 0,68±0,03 мкмоль/сек·л; у крыс, употреблявших 721 воду с медью, – 0,72±0,04 мкмоль/сек·л. Анализ данных, приведенных в табл. 1–3, свидетельствует о наличии нефротического синдрома. Возможной причиной патологических нарушений в почечной ткани является установленный нами дисбаланс в состоянии прооксидантно–антиоксидантной системы (табл. 5), свидетельствующий о наличии окислительного стресса. В литературе также имеются сведения о том, что повышенные дозы меди (более 1 ммоль) активируют свободнорадикальные процессы, что связано с реакциями Фентона и Хабер-Вейса.

Таблица 5.

Состояние прооксидантно-антиоксидантной системы в почках экспериментальных животных

Группы животных	МДА, мкмоль/г бел.	ДК, мкмоль/г бел.	ОАА, %	Каталаза, нмоль/мг бел.	СОД, нм/мг бел.
Контрольная группа (n=15)	0,168±0,012	0,435±0,021	54,51±2,08	9,81±0,65	417,22±12,68
Введение воды из г. Чугуева (n=15)	0,255±0,021 p<0,02	0,558±0,032 p<0,01	41,13±1,68 p<0,01	8,45±0,37 p<0,05	400,16±10,33 p>0,05
Введение 721 воды с хлоридом меди (n=15)	0,278±0,017 p<0,02	0,574±0,029 p<0,01	40,72±1,22 p<0,01	8,22±0,19 p<0,05	392,34±9,75 p>0,05

p – достоверность отличий по сравнению с контрольной группой.

Известно, что избыточное окисление липидов, вызванное недостаточностью антиоксидантной системы, приводит к нарушению соотношения холестерин/фосфолипиды в мембранах клеток и, как следствие, к нарушению проницаемости мембран. Вероятно, именно таков механизм появления трансаминазы в сыворотке крови.

Активация перекисного окисления липидов в биологических мембранах приводит к нарушению их барьерных функций, к изменению свойств мембран, что приводит к изменению активности мембраносвязанных ферментов, т.е. к нарушению функции клеток.

Изменение состава липидного слоя мембран может сказаться и на протекании тканевого дыхания. Изучение активности ферментов дыхательной цепи выявило снижение активности цитохромоксидазы и сукцинатдегидрогеназы (табл. 6). Установленные нами нарушения активности митохондриальных ферментов могут стать причиной низкоэнергетического сдвига в почечной ткани. Учитывая, что процессы транспорта веществ, секреции и реабсорбции в почечной ткани энергозависимы, можно предположить, что дефицит АТФ приведет к нарушению протекания метаболических процессов в почках. В частности, обнаружено снижение экскреции мочевой кислоты у экспериментальных животных, что связано со снижением ее секреции и является фактором развития дисметаболической нефропатии (табл. 4).

Таблица 6.
Активность митохондриальных ферментов и содержание АТФ в гомогенатах почечной ткани у экспериментальных животных

Группы животных	Сукцинат-дегидрогеназа, мкмоль/мин·г бел.	Цитохромоксидаза, мкмоль/мин·г бел.	АТФ, мкмоль/г ткани
Контрольная группа (n=15)	5,48±0,23	12,63±1,08	2,38±0,17
Введение воды из г. Чугуева (n=15)	3,85±0,17 p<0,01	10,32±0,98 p<0,02	1,82±0,11 p<0,02
Введение 721 воды с хлоридом меди (n=17)	4,11±0,22 p<0,01	11,07±1,02 p<0,02	1,90±0,12 p<0,02

p – достоверность отличий по сравнению с контрольной группой.

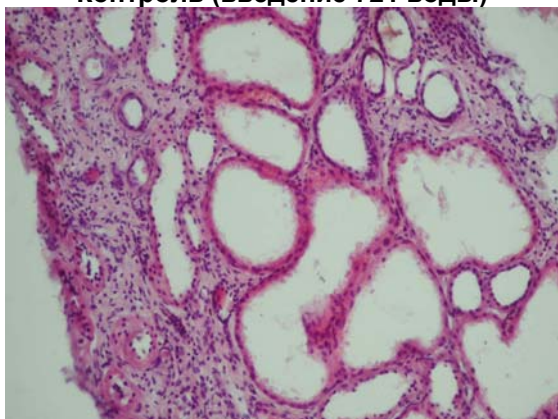
Морфологические исследования почек животных показали, что у крыс контрольной группы абсолютное большинство клубочков выглядят компактными, капилляры не имеют просвета, ядра эндотелиоцитов капилляров клубочков темные, сильно уплощенные (фото 1, 2). Кое-где можно увидеть тонкие и четкие PAS-позитивные базальные мембраны клубочковых капилляров. Просвет капсулы Боумена – широкий. Канальцевый эпителий хорошо сохранен, округлые, умеренной зухромности ядра, щеточная кайма канальцевого эпителия – широкая, интенсивно окрашивается фуксином (PAS-реакция). У животных, получавших избыточное количество меди, основная масса клубочков более крупные, гипертрофированы. Капилляры имеют округлое сечение, т.е. не спадаются после умерщвления животного, что объясняется жесткостью стенок капилляров в этих участках: базальная мембрана капилляров клубочков здесь утолщена, интенсивно PAS-позитивна, неравномерной толщины. Просвет капсулы Боумена резко снижен, в некоторых клубочках практически не просматривается. Эпителий канальцев существенно пострадал: апикальные части со щеточной каймой отсутствуют. Многие эпителиоциты с признаками начинающегося апоптоза. Апоптотические тельца многочисленны в слое эпителия канальца. Мезангиум содержит больше макрофагов по сравнению с группой контроля, что доказано также постановкой иммуногистохимической реакции с МСА (моноклональными антителами), CD-16. Анализируя полученные данные, можно сделать вывод о деструктивно-дистрофических изменениях в извитых канальцах. Данные морфологических и биохимических исследований позволяют предположить дисметаболическую нефропатию. Следует отметить, что в 7% случаев у животных морфологически подтвержден пиелонефрит. Следовательно, введение меди в повышенной дозе приводит к развитию нефропатии у 1-месячных крыс.

Полученные экспериментальные данные позволяют предположить следующий механизм развития нефропатии: накопление меди в ткани приводит к активации ПОЛ (перекисного окисления липидов), изменению липидного спектра мембран и вследствие этого – к развитию мембранодеструкции. Степень повреждения мембранных механизмов функционирования клеток определяет глубину и тяжесть патологических процессов. В развитии заболевания значительную роль играет и воспалительный компонент. Известно, что накопление меди активирует синтез провоспалительных интерлейкинов, стимулирует апоптоз, что способствует развитию тубулоинтерстициальной патологии.

Проведенные нами исследования показали, что внутрижелудочное введение кобальта приводит к увеличению его содержания в крови, накоплению в тканях, в частности в почках (табл. 8).

Значительное увеличение его концентрации отмечается также в печени, селезенке, надпочечниках. Следует отметить, что введение питьевой воды, содержащей повышенную концентрацию кобальта, приводит к появлению отеков конечностей, шеи, головы животных на 18–20-е сутки. Животные становились менее подвижными, теряли аппетит, снижалась масса (табл. 7). Практически у всех животных отмечалась с 18–19-ых суток микрогематурия, снижался диурез. При проведении клинического анализа мочи выявлено наличие гиалиновых цилиндров (3–5 в преп.), лейкоциты (15–20 в преп.), повышен удельный вес мочи (1,045±0,07 против 1,012±0,05 в контрольной группе), практически у всех животных выявлено повышенное количество эритроцитов.

Контроль (введение 721 воды)



Опыт (введение 721 воды с хлоридом меди)

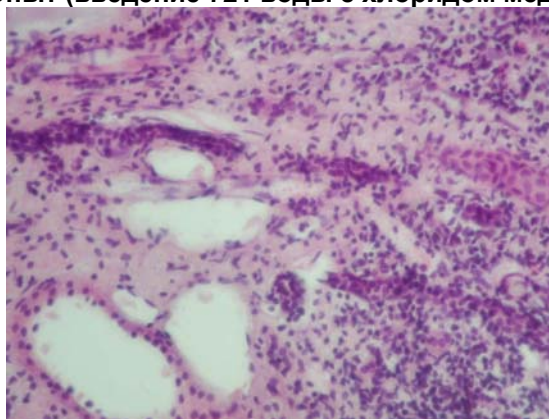
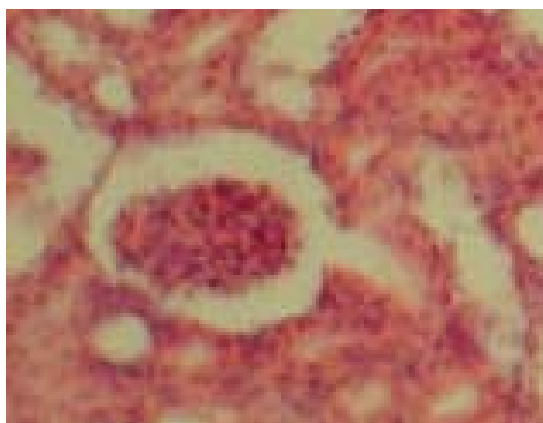


Фото 1. Микропрепарат почечных канальцев (опыт с хлоридом меди)

Контроль



Опыт (введение 721 воды с хлоридом меди)

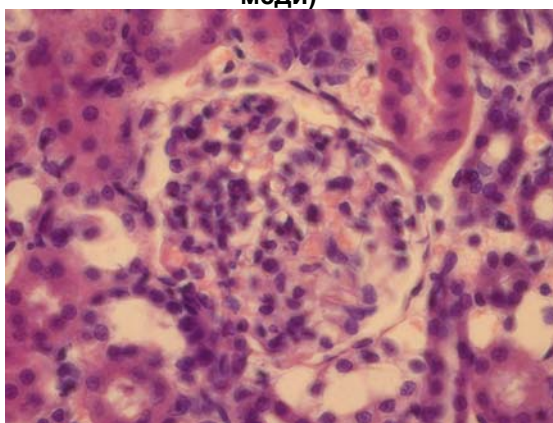


Фото 2. Микропрепарат почечных клубочков (опыт с хлоридом меди)

Таблица 7.

Динамика массы тела и удельной массы почек у экспериментальных животных, получавших избыточное количество хлорида кобальта в суточном рационе

Группы животных	Масса тела, г			Удельная масса почек, %		
	исходн.	15 суток	31 сутки	исходн.	15 суток	31 сутки
Контрольная группа (n=15)	89,25±5,18	100,75±7,63	120,26±7,13	3,54±0,12	3,58±0,22	3,49±0,31
Введение воды из г. Светловодска (n=15)	86,79±4,42	93,48±3,13 $p<0,05$ $p_1>0,05$	95,22±5,13 $p<0,05$ $p_1<0,02$	3,39±0,16 $p>0,05$	5,18±0,26 $p<0,02$ $p_1<0,01$	5,67±0,22 $p<0,02$ $p_1<0,05$
Введение 721 воды с добавкой хлорида кобальта (n=15)	90,06±6,33	98,42±4,12 $p<0,05$ $p_1>0,05$	98,03±6,34 $p<0,05$ $p_1<0,02$	3,61±0,22 $p>0,05$	4,89±0,17 $p<0,05$ $p_1<0,05$	5,79±0,19 $p<0,02$ $p_1<0,02$

p – достоверные отличия по сравнению с исходным уровнем,

p_1 – достоверные отличия по сравнению с контрольной группой.

После выведения животных из эксперимента макроскопически почки несколько увеличены в размере, набухшие, на разрезе корка серовато-коричневого цвета с мелким красным и сероватым крапом, пирамиды темно-красные.

На 31-е сутки в сыворотке крови животных, получавших в суточном рационе кобальт, снижается содержание общего белка, преимущественно за счет альбуминов (табл. 9, 10). Как видно из табл. 9, на 31-е сутки в сыворотке крови увеличивается содержание мочевины и креатинина, в моче увеличивается содержание белка.

Таблица 8.
Содержание кобальта в сыворотке крови и органах экспериментальных животных

Группы животных	Сыворотка крови, мкг/л	Печень, мг/100 г ткани	Надпочечники, мг/100 г ткани	Почки, мг/100 г ткани	Селезенка, мг/100 г ткани
Контрольная группа (n=15)	1,29±0,07	6,34±0,42	0,32±0,01	3,17±0,16	0,93±0,06
Введение воды из г. Светловодска (n=15)	2,11±0,14 p<0,01	12,44±1,22 p<0,001	0,47±0,02 p<0,01	15,83±1,02 p<0,01	1,28±0,08 p<0,05
Введение 721 воды с хлоридом кобальта (n=15)	2,23±0,12 p<0,01	11,89±1,22 p<0,001	0,44±0,03 p<0,01	16,04±1,08	1,36±0,09 p<0,05

p – достоверность отличий по сравнению с контрольной группой.

Таблица 9.
Содержание креатинина, мочевины, общего белка и мочевой кислоты в сыворотке крови и моче экспериментальных животных через 1 месяц после начала введения хлорида кобальта

Группы животных	Сыворотка крови				Моча			
	креатинин, мкмоль/л	мочевина, ммоль/л	общий белок, г/л	мочевая кислота, ммоль/л	креатинин, ммоль/сут.	мочевина, ммоль/сут.	общий белок, мг/сут.	мочевая кислота, ммоль/сут.
Контрольная группа (n=15)	75,83±3,11	7,22±0,45	76,52±3,14	0,31±0,02	10,25±0,85	417,48±19,45	311,45±20,08	2,16±0,11
Введение воды из г. Светловодска (n=15)	89,68±7,65 p<0,01	9,87±0,53 p<0,02	68,37±2,55 p<0,05	0,27±0,01 p>0,05	11,34±1,09 p>0,05	436,18±23,11 p>0,05	511,22±25,34 p<0,01	1,89±0,13 p>0,05
Введение 721 воды с хлоридом кобальта (n=15)	90,13±8,33 p<0,02	9,34±0,61 p<0,02	67,74±3,00 p<0,05	0,35±0,02 p>0,05	9,87±0,53 p>0,05	403,29±31,14 p>0,05	530,18±33,42 p<0,01	2,03±0,14 p>0,05

p – достоверность отличий по сравнению с контрольной группой.

Таблица 10.
Белковый спектр сыворотки крови в норме и при введении хлорида кобальта

Группы животных	Альбумин, %	Глобулины, %			
		α ₁	α ₂	β	γ
Контрольная группа (n=15)	57,45±3,11	4,85±0,33	8,72±0,29	18,34±1,22	10,64±0,93
Введение воды из г. Светловодска (n=15)	49,11±1,75 p<0,05	5,00±0,27 p>0,05	12,48±1,00 p<0,02	26,14±1,42 p<0,02	7,27±0,63 p<0,02
Введение 721 воды с хлоридом кобальта (n=15)	48,34±2,03 p<0,05	4,76±0,23 p>0,05	11,75±1,09 p<0,02	27,63±2,38 p<0,02	7,52±0,56 p<0,02

p – достоверность отличий по сравнению с контрольной группой.

Креатинин – один из важных компонентов остаточного азота, является конечным продуктом обмена креатина. Увеличение содержания креатинина отмечается при нарушении функции почек, независимо от этиологического фактора, степень креатинемии может быть показателем клубочковой фильтрации (т.к. креатинин не секретруется и не реабсорбируется). Известно, что увеличение креатинина в сыворотке крови до 213 мкмоль/л сопровождается увеличением фильтрации на 50%. У экспериментальных животных содержание креатинина в сыворотке крови увеличено, но почти в 2,5

раза меньше 213 ммоль/л, следовательно, нарушение фильтрации минимально. Повышение концентрации в крови мочевины – конечного продукта белкового обмена – один из важных признаков нарушения функции почек. Из фракций остаточного азота раньше всего увеличивается содержание мочевины и достигает более высоких значений по сравнению с другими фракциями.

Одновременное увеличение содержания креатинина и мочевины в сыворотке крови при практически неизменной их концентрации в моче может свидетельствовать о наличии нефропатии. Подтверждением наличия нефропатии служит установленное нами снижение содержания общего белка в сыворотке крови при увеличении его содержания в моче (табл. 9).

Анализ протеинограмм выявил уменьшение содержания альбумина и γ -глобулинов при увеличении содержания α_2 - и β -глобулинов (табл. 10), что соответствует нефротическому типу.

Как описано выше, кобальт активизирует ПОЛ в тканях, повышает синтез ФНО- α , оказывает влияние на функцию эндокринных органов, на функциональное состояние лимфоцитов (Theocharis, 1994), обладает выраженным сенсибилизирующим действием. В связи с этим можно предположить, что функциональные изменения в почках носят иммунно-воспалительный характер. Нами проведено изучение содержания провоспалительных интерлейкинов – ФНО- α и ИЛ-1 β в гомогенатах почечной ткани. Установлено, что содержание ФНО- α и ИЛ-1 β достоверно повышено у животных обеих групп, получавших кобальт (табл. 11).

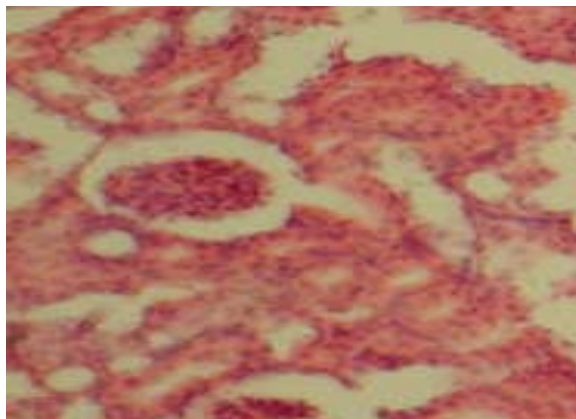
Таблица 11.

Содержание провоспалительных цитокинов и антифосфолипидных антител в гомогенатах почечной ткани

Группы животных	ФНО- α , нг/мл	ИЛ-1 β , нг/мл	Антифосфолипидные антитела, индекс реакции
Контрольная группа (n=15)	34,11 \pm 2,16	5,72 \pm 0,31	1,00 \pm 0,07
Введение воды из г. Светловодска (n=15)	168,13 \pm 9,45 p<0,001	20,68 \pm 1,33 p<0,001	2,43 \pm 0,11 p<0,001
Введение 721 воды с хлоридом кобальта (n=15)	155,11 \pm 7,48 p<0,001	18,64 \pm 1,08 p<0,001	2,07 \pm 0,14 p<0,001

p – достоверность отличий по сравнению с контрольной группой.

Контроль



Опыт (введение 721 воды с хлоридом кобальта)

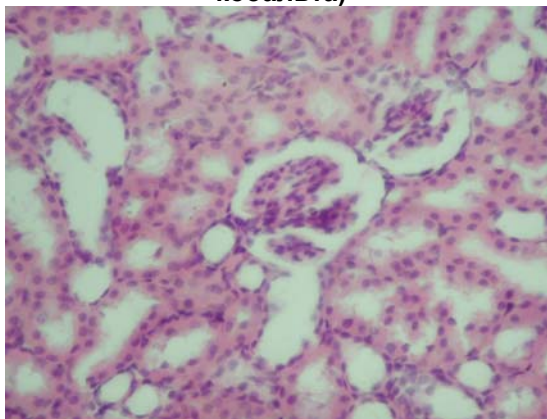


Фото 3. Микропрепарат почечных клубочков (опыт с хлоридом кобальта)

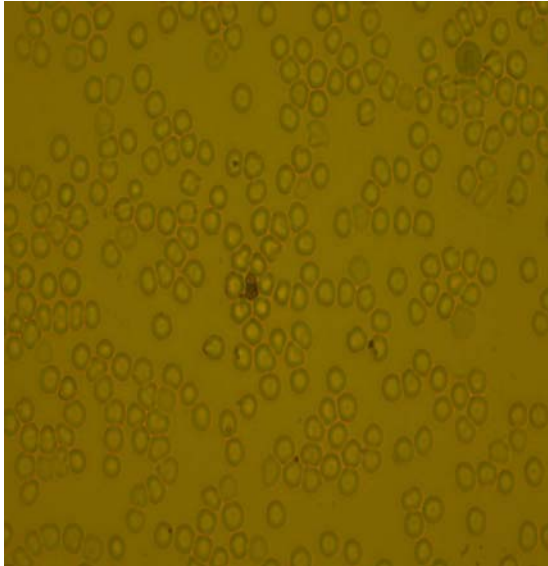
Об активации иммунной системы свидетельствует установленный нами факт повышения содержания катионных белков и активности миелопероксидазы нейтрофилов (фото 4, 5).

Известно, что в развитии аутоиммунного синдрома ведущую роль играет дисбаланс в процессах иммуногенеза и программированной клеточной смерти аутоцитотоксических лимфоцитов. В донозологической диагностике аутоиммунных заболеваний имеет значение выявление антинуклеазных, антимикросомальных и антимитохондриальных антител.

В последние годы иммунологи определяют более значительный вклад различных металлов, в том числе кобальта, в развитие аутоиммунных заболеваний (Хаитов и др., 1995).

Проведенное нами изучение содержания антифосфолипидных антител в сыворотке крови экспериментальных животных, получавших кобальт, показало увеличение их уровня, что свидетельствует об активации аутоиммунных процессов. Следует отметить, что проведенный нами анализ сыворотки крови у обследованных детей, проживающих в Светловодске, также достоверно показал увеличение содержания антифосфолипидных антител.

Контроль (введение 721 воды)



Опыт (введение 721 воды с хлоридом кобальта)

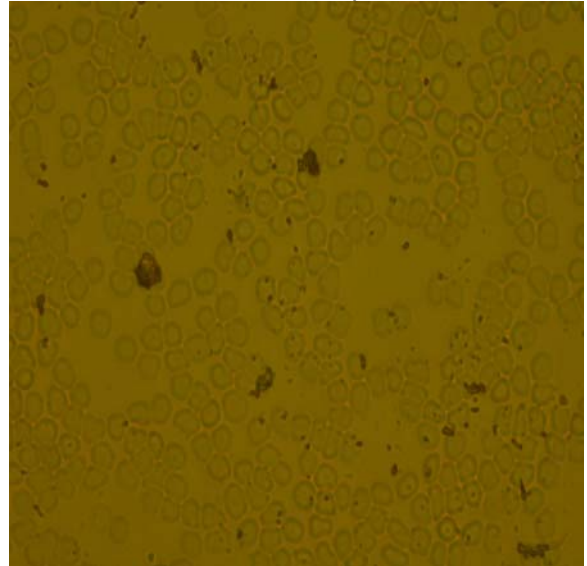
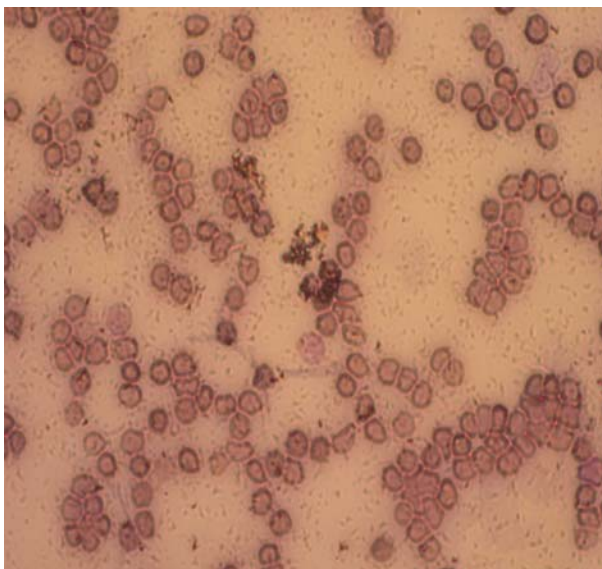


Фото 4. Катионные белки нейтрофилов

Контроль (введение 721 воды)



Опыт (введение 721 воды с хлоридом кобальта)

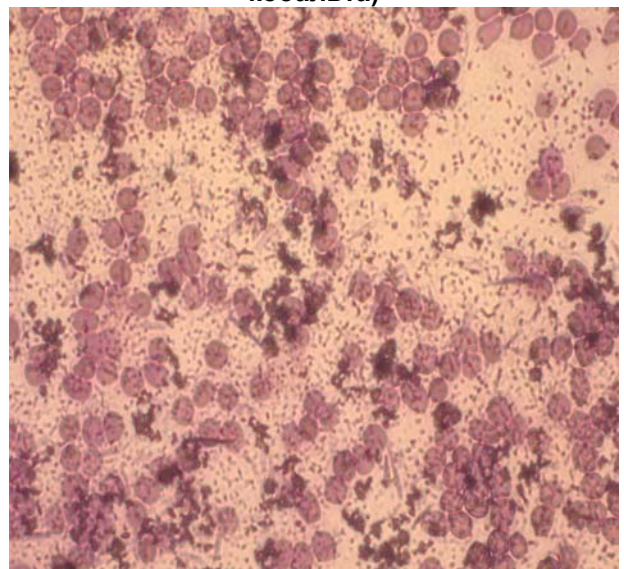


Фото 5. Миелопероксидаза нейтрофилов

Проведенные морфологические исследования выявили, что в почечных клубочках животных, получавших избыточное количество кобальта, отмечается небольшое расширение мезангиума, обогащение его макрофагами и лимфоцитами. Размеры клубочков очень варьируют, часто встречаются редуцированные и склерозированные клубочки, есть также гипертрофированные клубочки. Базальная мембрана капилляров утолщена. Мезангиум выглядит более плотным, содержит

значительное количество макрофагов и лимфоцитов. Строма диффузно обогащена макрофагами, лимфоцитами, фиброцитами. Имеется выразительное нарастание склероза мезангиума, базальных мембран капилляров, клубочков, канальцев, стромы почек. Анализ препаратов свидетельствует о развитии мезангиокапиллярного гломерулонефрита. В 12% случаев отмечается морфологическая картина, соответствующая пиелонефриту (фото 3).

Проведенные нами исследования позволяют предположить, что введение повышенных доз кобальта приводит к сенсибилизации замедленного типа, активации иммунно-воспалительного процесса, наработке антифосфолипидных антител, повреждению мембран и развитию нефропатии.

Выводы

1. Употребление воды с повышенным содержанием меди (1,75 мг/л из расчета 1 мл на 100 г массы животного) приводит к накоплению металла в печени, почках, надпочечниках, селезенке, снижению массы тела экспериментальных животных и увеличению удельной массы почек.

2. При избыточном поступлении меди в организм в почках крыс отмечается активация процессов перекисного окисления липидов при снижении общей антиоксидантной активности, что свидетельствует о развитии окислительного стресса.

3. У животных, получавших воду с избыточным содержанием меди, в сыворотке крови и моче повышается концентрация креатинина и мочевины, снижается экскреция мочевой кислоты, увеличивается протеинурия.

4. Избыточное поступление меди в организм крыс приводит к снижению активности ферментов цикла Кребса и концентрации АТФ в почечной ткани.

5. Данные биохимических и морфологических исследований позволяют сделать вывод о том, что при внутрижелудочном введении одномесечным крысам повышенных концентраций раствора хлорида меди развивается нефропатия.

6. Введение воды с повышенным содержанием кобальта (0,24 мг/л из расчета 1 мл на 100 г массы животного) приводит к его накоплению в печени, почках, селезенке, надпочечниках, уменьшению массы тела животных при увеличении удельной массы почек.

7. Увеличенное поступление в организм кобальта сопровождается повышением концентрации креатинина и мочевины в сыворотке крови и моче, протеинурией, снижением содержания альбумина в сыворотке крови при увеличении содержания β -глобулинов.

8. При увеличенном поступлении кобальта в организм возрастает концентрация провоспалительных цитокинов (ФНО- α и ИЛ-1 β) в сыворотке крови, повышается концентрация катионных белков и миелопероксидазы в нейтрофилах, увеличивается продукция антифосфолипидных антител.

9. Данные биохимических и морфологических исследований свидетельствуют о том, что при внутрижелудочном введении одномесечным крысам раствора хлорида кобальта развивается нефропатия. В основе механизма развития нефропатии лежит иммунновоспалительный процесс.

Список литературы

- Авцын А.П., Жаворонков А.А., Риш М.А., Строчкова Л.С. Микроэлементозы человека: этиология, классификация, органопатология. – Москва: Медицина, 1991. – 496с.
- Асатиани В.С. Ферментные методы анализа. – М.: Наука, 1969. – 560с.
- Башкірова Л., Руденко А. Біологічна роль деяких есенційних макро- та мікроелементів // Ліки України. – 2004. – №10. – С. 59–65.
- Брицке М.Э. Атомно-абсорбционный спектрохимический анализ. – Москва, 1982. – 280с.
- Волосовець О.П., Брюзгіна Т.С., Юрченко Н.Н. та ін. Особливості ліпідних показників крові у дітей, які проживають в зонах екологічного неблагополуччя стосовно важких металів та радіонуклідів // AML III. – 1997. – №3–4. – С. 66–71.
- Гаврилов Б.В., Мишкорудная М.И. СФ-метрическое определение содержания ГПЛ в плазме крови // Лабораторное дело. – 1983. – №3. – С. 33–36.
- Головачева В.А., Одинец Ю.В. Экзогенные факторы развития нефропатий у детей // Одесский медицинский журнал. – 2009. – №4 (114). – С. 29–33.
- Ещенко Н.Д. Определение содержания АТФ в тканях // Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен) / Под ред. М.И.Прохоровой. – Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1982. – С. 256–258.
- Ещенко Н.Д., Вольский Г.Г. Определение активности сукцинатдегидрогеназы // Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен) / Под ред. М.И.Прохоровой. – Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1982. – С. 210–212.

- Игнатова М.С., Харина Е.А., Солбилова Т.Н., Длин В.В. Непропатии в регионе, загрязненном солями тяжелых металлов, возможности лечебно-профилактических мероприятий // Терапевтический архив. – 2004. – №1. – С. 33–37.
- Кибанов Г.И., Бабенкова И.В., Тиселкин Ю.О. Определение общей антиоксидантной активности в сыворотке крови // Лабораторное дело. – 1988. – №5. – С. 59–62.
- Клінічна біохімія: навчальний посібник / За ред. проф. О.П.Тимошенко. – Київ: Професіонал, 2005. – С. 234–236, 261–262.
- Костюк В.А., Потапович А.И., Ковалева Ж.В. Простой и чувствительный метод определения активности СОД, основанный на реакции окисления кверцетина // Вопросы медицинской химии. – 1990. – №2. – С. 88–91.
- Лабораторные методы исследования в клинике: справочник / Под ред. В.В.Меньшикова. – М.: Медицина, 1987. – С.129.
- Магальяс В.М., Рудницький Р.І. Загальні закономірності нефротоксичності важких металів // Буковинський медичний вісник. – 2001. – Т.5, №3–4. – С. 181–183.
- Нефрология / Под ред. Н.Е.Тареевой. – М.: Медицина, 2000. – 688с.
- Подильчак М.Д. Клиническая энзимология. – Киев: Здоров'я, 1967. – С.87.
- Скальный А.В. Микроэлементозы человека (диагностика и лечение): Практическое руководство для врачей и студентов медицинских вузов, – М., 1997. – 93с.
- Ташке К. Введение в количественную цито-гистологическую морфологию. – Бухарест: Издательство АСРР, 1980. – 192с.
- Федорова Т.К., Коршунова Т.С., Ларская Э.Т. Реакции с ТБК для определения МДА крови методом флуорометрии // Лабораторное дело. – 1983. – №3. – С. 25–28.
- Хаитов Р.М., Пипегин Б.В., Истаков Х.И. Экологическая иммунология. – М., 1995. – 218с.
- Чвари С., Андел Т., Штрэнгер Я. Определение антиоксидантных параметров крови и их диагностическое значение в пожилом возрасте // Лабораторное дело. – 1991. – №10. – С. 9–13.
- Golovachova V. Influence of exogenous factors upon development of nephropathies in children // 2nd International Scientific Interdisciplinary Congress for medical students and young doctors. – Kharkiv: Kharkiv National Medical University, 2009. – P.29.
- Johnson D., Lardy H. Isolation of liver or kidney mitochondria // In: Methods in enzymology. Vol.X.N.Y. – Acad. Press, 1967. – P.94.
- Theocharis A.V. Trace element and apoptosis // Trace Elem. Biol. Med. – 1994. – №3. – P. 17–27.

Представлено: В.І.Жуковим / Presented by: V.I.Zhukov

Рекомендовано до друку: В.В.Мартиненко / Recommended for publishing by: V.V.Martynenko

Подано до редакції / Received: 13.10.2009.

© С.М.Мартінова, Є.Е.Перський, 2010

© S.N.Martynova, Ye.E.Persky, 2010